

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :
Yuichi HIRATSUKA et al. : Attn: APPLICATION BRANCH
Serial No. [NEW] : Docket No. 2000-1768A
Filed December 27, 2000 :
MICROSIZE DRIVING DEVICE AND : THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
METHOD FOR PREPARATION THEREOF : TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEE FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 23-0975.

**COVER LETTER ACCOMPANYING APPLICATION FILED IN A LANGUAGE
OTHER THAN ENGLISH UNDER 37 CFR 1.52(d)**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

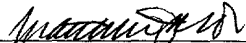
Sir:

Enclosed is a new patent application entitled "MICROSIZE DRIVING DEVICE AND METHOD FOR PREPARATION THEREOF". This application is submitted in the Japanese language under the provisions of 37 CFR 1.52(d)

The required filing fee of \$710.00 is enclosed.

Respectfully submitted,

Yuichi HIRATSUKA et al.

By 
Matthew Jacob
Registration No. 25,154
Attorney for Applicants

MJ/pjm
Washington, D.C.
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
December 27, 2000

MICROSIZE DRIVING DEVICE AND METHOD FOR PREPARATION THEREOF

BACKGROUND OF THE INVENTION

本発明は、マイクロメーターオーダーの領域内における線状駆動素子や回転駆動素子として、微小物質の輸送等に利用可能な新規微小駆動素子及びその製造方法に関するものである。

キネシン、ミオシンのように生体内に存在してそれ自体が運動機能を有する蛋白質は、一般にモーター蛋白質と称されている。このキネシンやミオシンは、アデノシントリホスフェート（以下ATPという）の加水分解によって発生するエネルギーを利用して、繊維状蛋白質、例えばマイクロチューブルやアクチンをそれらの繊維軸に沿って運動させる能力を有している。このような運動をする繊維状蛋白質はレール蛋白質と総称されている。

キネシンやミオシンの分子量は、それぞれ140 kDa、500 kDaであるのに対して実際に力を発生するドメインの大きさは、それぞれ 4×5 nm、 5×20 nmであって、非常に微小である。マイクロチューブルやアクチンにおいては直径数nmの分子が自己集積して繊維状の構造を形成しているので、それらの分子を生体外で自己集積させることにより、数10 μ mの長さの繊維にすることができる。

このようなモーター蛋白質分子については、これを基板の全面に吸着させ、レール蛋白質分子をその上に配置すると、ランダムな方向に運動すること及びこれを線状にパターン化したフッ素樹脂あるいはメタクリル酸系樹脂の層上に配列し、その上にレール蛋白質分子を配置すると、一次元的な双方向運動を行うことが知られている（Jpn. J. Appl. Phys., volume 34 (1995), pages 3937-3941; Biophys. J., volume 72 (1997), pages 1997-2001; Proc.Natl. Acad. Sci. USA, volume 83 (1986), pages 6272-6276及びCell, volume 42 (1985), pages 39-50参照）。

図1は、基板1上に膨成されたトラック2にこのようなモーター蛋白質分子の配列層3を設け、さらにその上にレール蛋白質分子4を配置した状態をモデル的に示した斜視図である。

このようなモーター蛋白質とレール蛋白質との間で生じる運動のエネルギーを取り出すことができれば、例えば微小物体の輸送用動力源として利用できるものと期待されるが、そのためには解決しなければならない2つの問題点がある。

第一の問題点は、基板1のトラック2内に配列したモーター蛋白質分子の配列の上に配置したレール蛋白質分子の消失を阻止することである。すなわち、従来の技術では、図1に示すように、モーター蛋白質分子を、フッ素樹脂あるいは（メタ）アクリル酸系樹脂で形成されたトラック2上に吸着させているが、これらのトラック2は基板1上に膨成されているため、この上に配置されたレール蛋白質分子4は、運動中にこのトラック2から脱落しやすく、時間の経過とともにその量が減少するのを免れない。したがって、長時間にわたってトラック2内での安定した運動を維持するための改良を施すことが必要である。

第二の問題点は、レール蛋白質分子の運動方向をいかにして制御するかということである。すなわち、これまでの方法でモーター蛋白質分子を線形トラックに配列し、その上にレール蛋白質分子を配置した場合、レール蛋白質分子は、そのトラックの長手方向に沿って双方向に運動するため、各分子の運動エネルギーが相殺され、それを取り出して駆動動力源として利用することができない。したがって、駆動動力源として利用できる運動エネルギーを得るには、運動を一方向に制御する必要がある。

しかしながら、これまでモーター蛋白質分子により運動させるレール蛋白質分子について前記の2つの課題を解決する試みは全く報告されていない。

SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、基板に設けられたトラック上のモーター蛋白質分子の配列からのレール蛋白質分子の脱落を抑制し、かつその運動方向を制御することにより、レール蛋白質分子の運動エネルギーを駆動動力源として利用可能にすることを目的としてなされたものである。

本発明者らは、モーター蛋白質分子の配列とその上に配置されて運動する

レール蛋白質分子によってもたらされる運動エネルギーを利用する方法を開発するために鋭意研究を重ねた結果、基板に設けられた線形トラックの形状を溝状とし、その底部のみにモーター蛋白質分子を付着させること、及びその溝の側面をある特定の方向（以下、順方向という）に移動するレール蛋白質分子の運動は許容するが、それと反対の方向（以下、逆方向という）に移動するレール蛋白質分子を阻止し、反転させて順方向に移動させる構造に形成させることにより、その目的を達成しうることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち、本発明が提供する微小駆動素子は、

(a) 線形トラック溝を有する基板、
(b) 線形トラック溝の底部に付着させたモーター蛋白質分子の配列、及び
(c) モーター蛋白質分子の配列の上に配置されたレール蛋白質分子、
を包含し、かつ該線形トラック溝が、ある特定の方向に移動するレール蛋白質分子の線形運動は許容するが、その特定方向と反対方向に移動するレール蛋白質分子を阻止反転させて上記所定方向に移動させる構造に形成された側面を有することを特徴とする。

本発明が提供する微小駆動素子の製造方法は

(A) 基板上に、ホトレジスト層を設け、ホトマスクを介してパターン露光したのち、現像することにより線形トラックパターンを形成すること、
(B) プラズマ処理又はスパッタリングによって基板の露光部から残留ホトレジスト層を除去して線形トラック溝を形成すること、
(C) モーター蛋白質含有液を線形トラック溝内に注入して、その底部にモーター蛋白質分子を付着させて分子配列を形成すること、及び
(D) その分子配列上にレール蛋白質分子を配置すること
の各工程を包含する。

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

図1は従来のモーター蛋白質とレール蛋白質との作用をモデル的に示す斜視図である。

図 2 は本発明による微小駆動素子のトラック溝の構造をモデル的に示す斜視図である。

図 3 はトラック溝の側面に切込を有する本発明の微小駆動素子の 1 例を示す斜視図である。

図 4 A 及び図 4 B はそれぞれ本発明におけるレール蛋白質分子の順方向及び逆方向の運動を示す説明図である。

図 5 A ないし図 5 G はそれぞれ本発明におけるトラック溝の側面の形状の 1 例を示す平面図である。

図 6 は本発明における線形トラック溝が円形環状である場合の 1 例を示す平面図である。

図 7 は実施例 5 で用いたトラック溝の側面の形状を示す平面図である。

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

次に添付図面に従って、本発明の実施態様の例を説明する。図 2 は、本発明の微小駆動素子の線形トラック溝の構造をモデル的に示す斜視図であり、図 3 はその線形トラック溝をある特定の方向に移動するレール蛋白質分子の直線運動は許容するが、その特定方向と反対の方向に移動するレール蛋白質分子を阻止、反転させて特定方向に移動させる形状を有する側面に形成した例の斜視図である。

これらの図において、基板 1 の上に設けられたトラック溝 2, 2' の底面には全面にわたってモーター蛋白質分子が付着して分子配列 3, 3' が形成されており、その上にレール蛋白質分子 4, ... が配置されている。図 3 においては、トラック溝 2, 2' のそれぞれの両側面には、くさび形の切り込み 5, 5' が設けられ、レール蛋白質分子 4, ... の矢印 A で示される方向（順方向）への移動は許容するが、矢印 B で示される反対の方向（逆方向）への移動を阻止し、反転させて順方向へ向わせるようになっている。

図 4 A 及び B は、レール蛋白質分子の挙動を示す説明図であって、線形トラック溝 2 の側面 6, 6' の形状としては、トラック溝 2 の幅が右から左に拡大、すなわち左から右に縮小するくさび状の切込状に形成されている。図 4 A の

矢印に沿って左から右に向かうレール蛋白質分子は、矢印に沿って円滑に移動し得るが、右から左に向かうレール蛋白質分子は、図4Bの矢印に沿って移動し、くさび型切込の底部aに衝突して進行が阻止され、反転して左から右の方向に移動する。この結果、線形トラック溝2の底面に配列されたモーター蛋白質分子により双方向運動するレール蛋白質分子は、特定の1つの方向すなわち図4A、Bにおける左から右に向って移動することになる。

図5A-Gは、それぞれトラック幅が左から右への方向に沿って縮小し、反対方向に向っては拡大するように形成された線形トラック溝に設けられたパターン形状の1例の平面図である。整流部分の形状は、これらに限定されるものではなく、その他にも多数の変形が可能である。図5A-Gにおいてそれぞれのパターンは、図4のパターンの場合と同じように左から右へとレール蛋白質の運動方向を整流する。その際、パターンの大きさについては、レール蛋白質分子が入ってくる側の幅が、レール蛋白質分子の長手方向の長さよりも広く、出口が狭くなっていると運動方向の整流作用が効率よく発現する。また、図5Gのパターンでは、レール蛋白質分子が整流部分に入ってくる方向と、整流部分から出ていく方向が一直線上にない。このような場合、出口側から逆走してきたレール蛋白質分子が、直接入り口から出ていくことがほとんどなくなるため、より優れた運動方向整流作用を示す。

本発明の微小駆動素子における基板としては、ケイ素、アルミニウム、タンタル、チタンなどの金属、ケイ酸塩ガラスなどのガラス類、ポリテトラフルオロエチレン、テトラフルオロエチレンとヘキサフルオロプロピレンとの共重合体、テトラフルオロエチレンとペルフルオロ（エテニルアルキルエーテル）との共重合体、ポリ（モノクロロトリフルオロエチレン）テトラフルオロエチレンとエチレンとの共重合体などのフッ素樹脂、ポリメチルメタクリレート、アクリル酸メチルとメタクリル酸メチルとの共重合体、アクリル酸エチルとメタクリル酸メチルとの共重合体などのアクリル酸系樹脂及びポリスチレンを用いることができる。これらの基板材料としては、使用するモーター蛋白質分子と親和性を有し、これと結合しやすいものを選んで用いるのが好ましい。

本発明の微小駆動素子におけるモーター蛋白質としては、キネシン、ミオシンなどを用いることができる。これらの蛋白質は、トラック溝への付着を容易にするためにあらかじめ改良しておくのが好ましい。このような改良は、例えば遺伝子工学的にモーター蛋白質自体の性質を改変する方法、あるいは生化学的にモーター蛋白質をビオチンでラベルし、ストレプトアビジンを介してトラック溝に付着させる方法によって行われる。

本発明の微小駆動素子に用いられるレール蛋白質としては、マイクロチューブやアクチンのような繊維状蛋白質が好ましい。

本発明の微小駆動素子における線形トラック溝は、その側面を、使用するモーター蛋白質分子が付着しにくい材料で形成するのが好ましい。このような材料としては、例えばメラミン系樹脂や（メタ）アクリル酸エステル系樹脂がある。

本発明の微小駆動素子は、以下に説明するように、ホトリソグラフィー技術を用いて作製するのが有利である。以下には、基板としてケイ酸塩ガラス、モーター蛋白質としてキネシン、レール蛋白質としてマイクロチューブを用いた例によって作製方法を説明する。

ケイ酸塩ガラス基板上にメラミン系又は（メタ）アクリル酸エステル系ホトレジスト層を厚さがおよそ $1\text{ }\mu\text{m}$ になるように形成し、ホトマスクを介して画像形成露光したのち現像して線形トラック溝のパターンを形成する。次に、キネシン溶液をこの線形トラック溝に接触させてキネシンをガラス基板に吸着させることが必要であるが、単に溶液を接触させるだけでは、ガラス面及び樹脂面のいずれにおいてもキネシン分子がアトラングムに吸着され、配列が形成されない。

線形トラック溝におけるキネシンの吸着は、疎水性結合とイオン性結合の二面性を有しているが、レジン面は疎水性であり、ガラス面はイオン性であるので、これらの性質の差異を利用して、ガラス面のみに選択的に吸着させることができる。すなわち、ガラス基板と接触させるキネシン溶液に非イオン性界面活性剤を添加することにより、レジン面へのキネシン分子の吸着を妨げ、ガラス面のみに吸着させることができる。この際用いる非イオン性界

面活性剤としては、アルキルアリールポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン・ソルビタンモノパルミテート、ラウリルアルコールポリエチレンオキシド付加物などが好適である。このようにして得られる線形トラック溝内では、マイクロチューブルはきわめて安定な運動を行い、数時間以上にわたってトラックに拘束された移動を示すようになる。

他のモーター蛋白質、例えばミオシンは、基板材料に対し異なった挙動を示す。その場合は遺伝子工学的な改変を行って、キネシンと同様の結合特性に変えることができるので、キネシン以外のモーター蛋白質を用いる場合も同じ方法で本発明の素子を製造することができる。いうまでもなく、使用するモーター蛋白質に適合した基板材料を選べば、モーター蛋白質を改変することは不必要である。

前記の方法において、モーター蛋白質分子の基板への吸着性を高めるには、現像処理後に基板上に残留するホトレジスト膜を完全に除去することが有効である。レジスト膜の除去方法としては、酸素プラズマエッチング処理や、不活性ガスによるスパッタリング処理がある。

図6に示すように、本発明の微小駆動素子における線形トラック溝を環状に形成することにより一方向のみにレール蛋白質分子が運動する回転駆動素子を得ることができる。

このようにして得られる微小駆動素子を用いれば、レール蛋白質分子に、ガラスやポリスチレンの超微細粒子を結合させ、これを輸送することができる。円形に形成されたトラック溝を有する微小回転駆動素子を用い、この円周上にレール蛋白質分子に結合した歯車を連結してこれを回転させることもできる。さらに、レール蛋白質分子が自由に運動しうる領域を2個形成し、その間を整流可能な線形トラックで連結すれば、レール蛋白質分子に物体を担持させて微小空間輸送することができる。

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

基板としてのケイ酸塩ガラス板上にネガ型ホトレジスト液（商品「SAL 601」、シップレイ社製メラミン樹脂系ホトレジスト組成物）を滴下し、ス

ピンコートにより塗布して乾燥後の厚さが $1\text{ }\mu\text{m}$ となる塗膜を形成した。塗膜を乾燥した後、ホトマスクを通してパターン露光し、現像液（MICROPOSIT Developer MF-312、シップレイ社の商品名）を用いて現像することにより、幅 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、長さ $500\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $1\text{ }\mu\text{m}$ の溝状のトラックパターンを基板表面に形成した。

現像された基板を乾燥させた後、 0.1% の非イオン界面活性剤（Triton X100、ローム・アンド・ハース社の商品名、アルキルアリールポリエチレングリコール）、 50 mM の酢酸カリウム、 10 mM のトリス酢酸（ $\text{pH } 7.5$ ）、 4 mM の硫酸マグネシウム、 1 mM のエチレングリコールビス（2 - アミノエチルエーテル）四酢酸、 7 mM の2 -メルカプトエタノール及び $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ のカゼインを含有する緩衝液に、キネシンを $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 又は $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 濃度となるように溶かした液をトラック溝上に滴下し、室温で2分間保持して、キネシン分子をガラス基板上に付着させようとしたが、レジン面とガラス面のいずれにも付着せず、キネシン分子の配列は得られなかった。

そこで、基板面をあらかじめ酸素流速 150 ml/分 、高周波電力 280 W 、 60 秒の条件で酸素プラズマエッチング処理した以外は上記と同じ操作を繰り返したところ、キネシンはレジン面には付着せず、ガラス面のみに選択的に付着してキネシン分子の配列が得られた。

このようにして得た線形トラック溝上にマイクロチューブル溶液を滴下してマイクロチューブルをキネシンに結合させたのち、ATPを添加し、マイクロチューブルの運動を開始させたところ、マイクロチューブルは、トラック溝内においてトラックの壁に沿って移動し、トラック外に脱落することなく、ほぼ 100% の確率で方向転換しながら双方向往復運動を継続した。

実施例 2

ガラス基板上にメタクリル酸エステル樹脂系ポジ型ホトレジスト液を滴下し、スピンコート法により、乾燥後の膜厚さが $1\text{ }\mu\text{m}$ になるように塗布し、 $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 10 分間乾燥させた。ホトマスクを通して波長 254 nm の光でパターン露光した後、メチルイソブチルケトンを用いて現像した。この結果、露光部分が取り除かれ、実施例 1 と同様のトラック溝が形成された。この基

板を酸素プラズマエッチングし、非イオン性界面活性剤を含んだキネシン溶液を滴下し、キネシンを吸着させた。キネシンはガラス基板面に選択的に吸着され、レジン面には吸着されなかった。実施例 1 と同様の方法を用いて基板面にマイクロチューブル及び ATP を添加したところ、トラック溝内にマイクロチューブルの運動を制限することができ、運動は線形トラック溝に沿った双方向運動であった。

比較例

ガラス基板上に幅 1.5 ないし $2.5 \mu\text{m}$ 、半径 $60 \mu\text{m}$ 及び $30 \mu\text{m}$ の二重円周状にトラック溝を形成した以外は実施例 1 と同様の方法によってキネシン分子の配列を形成し、その上にマイクロチューブル分子を配置して運動させた。このようにして得られたマイクロチューブルの運動は円周状トラック溝に沿った時計回りと反時計回りの双方向の回転運動であったが、回転方向の制御はなされなかった。

実施例 3

上記比較例と同じ円周状パターンであるが、マイクロチューブルの回転運動の方向を制御する目的で、図 6 に示すような側面にくさび形の切込をもつ 2 重円周状のトラック溝を基板上に形成した以外は比較例と同じ方法によってキネシン分子の配列を行い、マイクロチューブルを回転運動させた。マイクロチューブル分子の回転運動の方向は、整流パターンによって意図した方向と完全に一致していた。このようにして、外側の円周トラック溝上では反時計回りに、内側の円周トラック溝上では時計回りにマイクロチューブルの運動を制御することができた。

実施例 4

整流パターンの性能を評価するために、図 5 A, 5 B, 5 C 及び 5 D に示す 4 通りのパターンについて整流性能の数値評価を試みた。整流パターンへのマイクロチューブルの進入方向が順方向の場合及び逆方向の場合に、その整流パターンを方向転換せずにマイクロチューブルが通過する場合の確率 s 値(順方向)及び t 値(逆方向)を実測した。 s 値が小さいほど整流効果が確実であることを示す。その結果は、 t 値はいずれの場合も 1.00 であったが

s 値はそれぞれ 0.27、0.42、0.59 及び 0.82 であり図 5 D の整流パターンの整流効果は良好とはいえなかった。すなわち、これらの 4 種類の整流パターンの中では図 5 A の整流パターンが際立って高い整流効率を示すことがわかった。

実施例 5

マイクロチューブルをビオチンでラベルされたスクシイミドを用いてビオチンでラベルした。直径 1 μm のポリスチレンのビーズをビオチンでラベルされた牛血清アルブミンでコートし、さらにストレプトアビジンを加え、ビオチンでラベルされた牛血清アルブミンと結合させ、ビーズ表面をストレプトアビジンでラベルした。ストレプトアビジンはビオチン結合部位を 1 分子あたり 4 箇所有するので、ビーズ表面は、さらにビオチンが結合できるようになった。そのため、ビオチンでラベルされたマイクロチューブルにストレプトアビジンでラベルされたビーズを結合させることができた。このようなマイクロチューブルを図 7 のパターンのキネシン分子配列を有する基板に吸着させ、パターン内でマイクロチューブルにビーズを輸送させることができた。